مجله به‌نژادی نهال و بذر
جلد ۱-۳۴، شماره ۱، سال ۱۳۹۷

ارزیابی قرابت ژنتیکی نمونه‌های جمعیتی خار مریم (*Silybum marianum* L.) با استفاده از نشانگرهای SCoT و CDDP

Assessment of Genetic Diversity in Milk Thistle (*Silybum marianum* L.) Accessions Using SCoT and CDDP Markers

مهرآنا کوهی دهکردی[۱]، اعظم رفیع‌زاده[۲] و الهه لطیفی[۳]

۱- استادیار، گروه علوم کشاورزی، دانشگاه پیام نور اصفهان، اصفهان، ایران
۲- کارشناسی ارشد، گروه علوم کشاورزی، دانشگاه پیام نور اصفهان، اصفهان، ایران
۳- کارشناسی ارشد، گروه علوم پایه، دانشگاه پیام نور، اصفهان، اصفهان، ایران

تاریخ دریافت: ۱۳۹۶/۱۱/۴　　تاریخ پذیرش: ۱۳۹۶/۱۲/۲۸

چکیده

کوهی دهکردی، م.، رفیع‌زاده، ا.، و لطیفی، ا. ۱۳۹۷. ارزیابی قرابت ژنتیکی نمونه‌های جمعیتی خار مریم (*Silybum marianum* L.) با استفاده از نشانگرهای CDDP و SCoT. **مجله به‌نژادی نهال و بذر ۱-۳۴:** ۸۰-۶۳. **10.22092/spij.2018.118629**

خارمریم با نام علمی *Silybum marianum* L. **گیاهی از خانواده کاسنی است که به دلیل دارا بودن متابولیت‌های ثانویه‌ی مهمی مانند سیلی‌مارین از خواص درمانی بالایی برخوردار است. با توجه به اثر درمانی قابل توجه این گیاه و لزوم کشت آن در ایران، شناخت تنوع ژنتیکی آن به منظور بهره‌گیری در برنامه‌های به‌نژادی از اهمیت بالایی برخوردار است. در تحقیق حاضر، قرابت ژنتیکی هشت نمونه جمعیتی خارمریم با استفاده از نشانگرهای** CDDP **و** SCoT **مورد بررسی قرار گرفت. بر اساس نتایج ارزیابی مولکولی، از تعداد هفت آغازگر** SCoT**، در مجموع ۶۲ نوار قابل‌تشخیص به دست آمد که ۵۳ نوار (۸۵/۴۸٪) چندشکل بود در حالی‌که از هفت آغازگر** CDDP**، در مجموع ۵۸ نوار قابل‌تشخیص به دست آمد که ۵۰ نوار (۸۶/۲٪) چندشکلی نشان دادند. میانگین شاخص محتوای چندشکل** (PIC) **حاصل از نشانگرهای** CDDP **و** SCoT **به ترتیب برابر با ۰/۳۹ و ۰/۲۳ بود. نتایج حاصل از تجزیه خوشه‌ای نشانگر** SCoT **و** CDDP **توانست نمونه‌های خار مریم را به سه گروه تقسیم کند. نشانگرهای** CDDP **و** SCoT **هر دو تنوع درون جمعیتی بیشتری را نسبت به تنوع بین جمعیتی نشان دادند. سطح بالای تنوع ژنتیکی مشاهده شده در نمونه‌های مورد مطالعه می‌تواند در برنامه‌های به‌نژادی آینده مورد استفاده قرار گیرد.**

واژه‌های کلیدی: تنوع ژنتیکی، چندشکلی، متابولیت، نشانگر مولکولی، سیلی‌مارین.

نگارنده مسئول: m.koohi@gmail.com　　تلفن: ۰۳۱۳۳۵۲۱۰۲۳

مقدمه

خار مریم یا ماریتیغال با نام علمی *Silybum marianum.* L. از جمله گیاهان دارویی با ارزش در درمان بسیاری از بیماری‌هاست که این امر به دلیل وجود متابولیت‌های ثانویه‌ی مهم ازجمله فلاونوئیدهایی مانند سیلی‌مارین در این گیاه می‌باشد که خواص درمانی از خود نشان می‌دهد (Katiyar *et al*., 2008). تعیین تنوع ژنتیکی در بین و درون جمعیت‌ها به منظور بهبود گیاهان دارویی اهمیت زیادی دارد. علاوه بر این، شناسایی روابط ژنتیکی میان جمعیت‌ها یا ژنوتیپ‌ها برای استفاده بهینه از منابع ژنتیکی گیاهی ضروری است (Tange *et al*., 2007). در این راستا می‌توان به اهداف به‌نژادی مهم در خارمریم از جمله افزایش میزان متابولیت‌های ثانویه در این گیاه مانند سیلیمارین، افزایش عملکرد بذر، همزمانی در گلدهی و عدم ریزش اشاره نمود (Alemardan *et al*., 2013).

از معیارهای متفاوتی شامل صفات مورفولوژیکی، نشانگرهای بیوشیمیایی یا مولکولی جهت برآورد تنوع ژنتیکی استفاده شده است (de Vicente *et al.,* 2005; Carvalho, 2004). با این حال، اعتقاد بر این است که استفاده از نشانگرهای مولکولی نسبت به نشانگرهای مورفولوژیکی از قابلیت اعتماد و تکرارپذیری بالاتری برخوردار است (Carvalho, 2004). در سال‌های اخیر نشانگرهای مولکولی به عنوان یک رویکرد مدرن، مناسب، سریع و مقرون به صرفه برای شناسایی ارقام و تشخیص تنوع گونه‌ای مورد استفاده قرار گرفته و از آن‌ها در تحقیقات متعددی از جمله شناسایی ترکیب ژنتیکی جمعیت گیاهان، تنوع زیستی، شناسایی ژن‌های دخیل در بروز صفات مهم زراعی و انتخاب به کمک نشانگر بهره‌گیری شده است (Sonah *et al*., 2011).

در گیاه خارمریم، به خصوص اکوتیپ‌هایی که در ایران وجود دارند، مطالعات مولکولی محدودی صورت گرفته است به عنوان نمونه نشانگر SSR به منظور بررسی تنوع ژنتیکی توده‌های خارمریم مورد استفاده قرار گرفت و بر اساس نتایج بدست آمده کاربرد این نشانگر در بررسی تنوع ژنتیکی ماریتیغال کارآمد گزارش شد (Hoseini, 2011). نتایج بررسی تنوع ژنتیکی ماریتیغال با کمک نشانگر AFLP با میانگین درجه تمایز ژنی (۰/۴۴) نشان داد که درصد بالایی از تنوع کل مربوط به تنوع درون اکوتیپ‌های مورد مطالعه بود. تجزیه خوشه‌ای داده‌های AFLP با استفاده از فاصله ژنتیکی، اکوتیپ ها را به سه گروه منتسب کرد که تا حدودی با الگوی جغرافیایی محل رویش اکوتیپ ها مطابقت داشت (Shokrpour *et al*., 2008).

در مطالعات اخیر کاربرد نشانگرهای اختصاصی متصل شونده به ژن‌های خاص، چندشکلی نواحی هدف کدون شروع (Start Codon Targeted Polymorphism: SCoT) و

نشانگر چندشکلی مشتق شده از DNA حفاظت شده (Conserved DNA-Derived Polymorphism: CDDP) به دلیل مزایای آن‌ها نسبت به سایر نشانگرهای مولکولی، مورد توجه زیادی قرار گرفته است. نشانگر SCoT نشانگری غالب است که بر اساس مناطق کوتاه حفاظت شده اطراف رمز کدون آغاز (ATG) ژن گیاهی طراحی شده است و بر پایه تنوع در ناحیه حفاظت شده کدون آغاز عمل می کند (Collard and Mackill, 2009a; Xiong *et at al.,* 2011). در مقایسه با نشانگر RAPD، به دلیل استفاده از آغازگرهای طویل‌تر و دمای اتصال بالاتر از تکرارپذیری بالایی برخوردار است (Poczai *et al.*, 2011).

نشانگر اسکات (SCoT) برای اکثر قریب به‌اتفاق آزمایشگاه‌های تحقیقاتی گیاهی با تجهیزات استاندارد مناسب است و برای ارزیابی تنوع ژنتیکی، شناسایی ارقام، نقشه‌برداری جایگاه صفات کمی (QTL) و انگشت‌نگاری DNA در گونه‌های مختلفی از جمله برنج (Collard and Mackill, 2009b)، بادام‌زمینی (Xiong *et al.*, 2009)، سیب‌زمینی (Gorji *et al.*, 2011)، انبه (Luo *et al.*, 2011)، انگور (Guo *et al.*, 2012)، ارکیده (Bhattacharyya *et al.*, 2013)، نیشکر (Que *et al.*, 2014)، و نخود زراعی (Hajibarat *et al.*, 2015) موفقیت‌آمیز بوده است.

نشانگر CDDP مبتنی بر مناطق حفاظت شده است که در آن از یک آغازگر واحد برای آغازگرهای پیشرو و پسرو استفاده می‌شود. همچنین این نشانگر آغازگرهایی با طول بیشتر دارد و با دماهای اتصال ۵۰ تا ۷۰ درجه سانتی‌گراد طراحی شده است که افزایش تکرارپذیری آن را باعث می‌شود (Collard and Mackill, 2009b). در این روش مانند روش‌های RAPD و ISSR ، طراحی آغازگرها براساس توالی ابتدا و انتهای قطعات DNA انجام می‌شود با این تفاوت که در این روش، ناحیهٔ محافظت‌شده، یک ژن خاص است (Williams *et al.*, 1990).

از مزایای روش CDDP می‌توان به ساده‌بودن، تکرارپذیری زیاد، نیاز به امکانات آزمایشگاهی کم و نیاز به DNA الگوی بسیار کمتر نسبت به سایر روش‌ها اشاره کرد. معمولا محدودهٔ اندازهٔ این نشانگر بین ۲۰۰ تا ۱۵۰۰ جفت باز (bp) است (Poczai *et al.*, 2011). کاربرد نشانگر CDDP برای ارزیابی تنوع ژنتیکی و شناسایی ارقام در گونه‌های مختلف از جمله برنج (Collard and Mackill, 2009b)، گل داوودی (Li *et al.*, 2013)، گل صدتومانی (Wang *et al.*, 2014)، گندم (Hamidi *et al.*, 2014) و سیب‌زمینی (Poczai *et al.*, 2011) موفقیت‌آمیز گزارش شده است.

پژوهش حاضر با هدف ارزیابی قرابت ژنتیکی و فاصله موجود در نمونه‌های جمعیتی

خارمریم با استفاده از نشانگرهای بارز CDDP و SCoT انجام شد. در این پژوهش تنوع ژنتیکی میان نمونه‌های جمعیتی موجود خار مریم به‌منظور شناسایی و معرفی بهترین جمعیت برای به‌نژادی این گیاه دارویی ارزشمند ارزیابی و کارایی نشانگرهای CDDP و SCoT در مطالعه تنوع ژنتیکی خار مریم مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

هشت نمونه جمعیتی از گیاه دارویی خارمریم (*Silybum marianum* L.) متشکل از هفت نمونه ایرانی شامل نمونه‌های جمع‌آوری شده از اردستان (A)، خرم‌آباد (K)، خمین (N)، اهواز (H)، ملاثانی (L)، ساری (S)، اصفهان (سفید اصفهان، E) و یک نمونه وارداتی مجارستانی (M) مورد مطالعه قرار گرفت و بذور آن‌ها از شرکت پاکان بذر اصفهان تهیه شد. پس از رویش بذرها، برگ‌های جوان (در مرحله ۵-۴ برگی)، برای استخراج DNA نمونه‌برداری شد. از هر نمونه جمعیتی، پنج گیاه مورد مطالعه قرار گرفت.

استخراج DNA ژنومی از برگ‌های جوان خارمریم، بر اساس روش CTAB (Murray and Thompson, 1980) با تغییراتی، از جمله افزایش میزان بتامرکاپتول اتانول و تغییر در زمان قرار دادن نمونه‌ها داخل یخ، صورت گرفت. کمیت و کیفیت DNA استخراجی، با استفاده از دستگاه اسپکتوفتومتر UV-2550 و بارگیری روی ژل آگارز ۰/۸٪ مورد بررسی قرار گرفت.

آغازگرهای SCoT مورد استفاده در این تحقیق بر اساس آغازگرهای گزارش شده در تحقیقات مشابه بر اساس نمایش بیشترین میزان چندشکلی (۱۰۰ درصد) (Pakseresht *et al.*, 2013; Zarei *et al.*, 2013; Que *et al.*, 2014; Zhang *et al.,* 2015) و آغازگرهای CDDP با پیروی از طراحی کلارد و مک کیل (Collard and Mackill, 2009b) انتخاب و سنتز آن‌ها توسط شرکت سینا ژن انجام شد. مشخصات آغازگرهای مورد استفاده در جدول ۱ ارائه شده است.

واکنش تکثیر در حجم نهایی ۱۰ میکرولیتر شامل ۵ میکرولیتر مسترمیکس 2X (آمپلیکون)، ۰/۸ میکرولیتر آغازگر (۱۰ میکرومولار) و ۱ میکرولیتر DNA ژنومی (۴۰-۲۰ نانوگرم) انجام شد. تکثیر PCR با استفاده از شرایط: واسرشت سازی اولیه در ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت چهار دقیقه، ۳۵ چرخه شامل: واسرشت سازی DNA در ۹۵ درجه سانتی گراد به مدت یک دقیقه، اتصال آغازگر به DNA تک‌رشته‌ای متناسب با هر آغازگر (۶۰-۵۰ درجه سانتی گراد) به مدت یک دقیقه، بسط آغازگر در دمای ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت دو دقیقه و تکمیل بسط ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت پنج دقیقه انجام شد. محصولات PCR روی ژل آگارز ۱/۲٪ در

جدول ۱- مشخصات آغازگرهای SCoT و CDDP مورد استفاده در بررسی تنوع ژنتیکی نمونه‌های جمعیتی خار مریم

Table 1. Description of SCoT and CDDP primers used for evaluation of genetic diversity in *Sylibum marianum*

نوع نشانگر Marker type	نام نشانگر Marker name	توالی Sequence (5′-3′)	٪CG	Temperature (°C)
SCoT	SCoT6	CAA CAA TGG CTA CCA CGC	56	55
	SCoT12	ACG ACA TGG CGA CCA ACG	58	61
	SCoT17	ACC ATG GCT ACC ACC GAG	58	61
	SCoT42	CAA TGG CTA CCA TTA GCG	54	50
	SCoT48	ACA ATG GCT ACC ACT GGC	56	55
	SCoT49	ACA ATG GCT ACC ACT GCG	56	55
	SCoT52	ACA ATG GCT ACC ACT GCA	54	50
CDDP	WRKY-R3	GCA SGT GTG CTC GCC`	73	54
	ERF3	TGG CTS GGC ACS TTC GA	65	57
	KNOX-1	AAG GGS AAG CTS CCS AAG	61	58
	WRKY-R3B	CCG CTC GTG TGS ACG	73	54
	MYB1	GGC AAG GGC TGC CGC	80	57
	MYB2	GGC AAG GGC TGC CGG	80	57
	MADS-1	ATG GGC CGS GGC AAG GTG C	74	66

بافر TBE 1X به مدت ۴۵ تا ۶۰ دقیقه و با شدت‌جریان ۸۰ ولت بارگیری شدند. رنگ آمیزی DNA به کمک DNA Green Viewer (پارس طوس) انجام شد و عکس‌برداری نوارها با استفاده ژل‌داک (Bio Rad) صورت گرفت.

الگوی نواری به‌دست‌آمده توسط هر آغازگر در صورت وجود نوار (۱) و عدم وجود نوار (۰) امتیازدهی شد. شباهت ژنتیکی در میان جمعیت‌ها با محاسبه ضریب شباهت (similarity coefficient) مورد بررسی قرار گرفت. میزان شباهت یا تفاوت در بین جمعیت‌ها توسط ماتریس تشابه (Similarity Matrix) به کمک نرم‌افزار GenALEX6.3 تعیین شد. آنالیز خوشه‌ای با استفاده از روش الگوریتم UPGMA و تجزیه و تحلیل مولفه اصلی (PCA) به کمک نرم افزار NTSYS-PC, Version 2.02 انجام شد. تحلیل در سطح گونه جهت تعیین تنوع ژنتیکی و میزان چند شکلی بین و درون گونه‌ها به کمک نرم‌افزار GenALEX6.3 صورت گرفت (Rohlf, 1993).

نتایج و بحث

در پژوهش حاضر از دو نشانگر SCoT و CDDP برای ارزیابی قرابت ژنتیکی ۴۰ گیاه دارویی خارمریم (شامل پنج گیاه از هر یک از هشت نمونه جمعیتی مورد مطالعه) استفاده شد. با استفاده از هفت آغازگر SCoT در مجموع

۶۲ نــوار قابــل ارزیــابی در محــدوده بــین ۲۰۰۰-۲۵۰ جفت باز تولید شد (شکل ۱). از این تعداد ۵۳ نوار چندشکل (۸۵/۴۸٪) بود. درصد چندشکلی نوارها در کل آغازگرها در محدوده‌ی ۶۰ تا ۱۰۰٪ با میانگین ۸۵/۴۸٪ محاسبه شد. بیشترین تعداد نوار تولید شده متعلق به آغازگر SCoT6 (۱۳ نوار) بود در حالی‌که کمترین تعداد نوار قابل ارزیابی در آغازگر SCoT42 (۵ نوار) مشاهده شد و میانگین نوارهای چندشکل ۷/۵۷ بدست آمد (جدول ۲).

جدول۲- نتایج تکثیر حاصل از آغازگرهای SCoT و CDDP مورد استفاده در نمونه‌های جمعیتی خار مریم

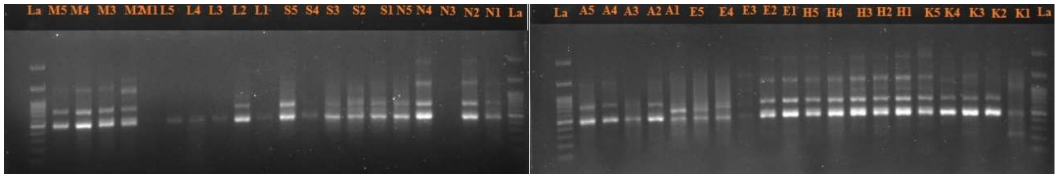
Table 2. SCoT and CDDP primers and their amplification results generated in *Syblium marianum* accessions

نوع نشانگر Marker type	نام نشانگر Marker name	Amplicon length (bp)	TNB	NPB	P(%)	PIC	MI
SCoT	SCoT6	250-1900	13	13	100	0.29	3.86
	SCoT12	500-1950	12	12	100	0.22	2.67
	SCoT17	800-1800	11	11	100	0.18	2.02
	SCoT42	600-1500	5	3	60	0.35	1.06
	SCoT48	450-1400	8	6	75	0.24	1.45
	SCoT49	300-1500	7	4	57	0.12	0.48
	SCoT52	800-2000	6	4	66.66	0.24	0.98
	Mean		8.85	7.57	79.8	0.23	1.79
CDDP	WRKY-R3	300-1500	8	8	100	0.38	3.04
	ERF3	250-1750	8	8	100	0.32	2.59
	KNOX-1	150-1800	8	8	100	0.45	3.61
	WRKY-R3B	300-1500	6	2	33.33	0.31	0.61
	MYB1	350-1700	8	6	75	0.43	2.61
	MYB2	300-1800	13	13	100	0.43	5.59
	MADS-1	300-1500	7	5	71	0.43	2.16
	Mean		8.28	7.14	82.76	0.39	2.89

TNB: تعداد کل نوارها، NPB: تعداد نوارهای چندشکل، P(٪): درصد چندشکلی، PIC: محتوای اطلاعات چندشکل، MI: شاخص نشانگر.

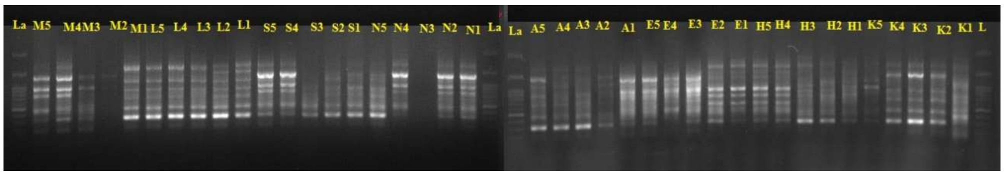
TNB: Total number of bands, NPB: Number of polymorphic bands, P (%): Percentage of polymorphism, PIC: Polymorphic information content, MI: Marker index.

بر اساس نتایج حاصل از هفت آغازگر CDDP مورد استفاده در این پژوهش، در مجموع ۵۸ نوار قابل ارزیابی در محدوده‌ی ۱۸۰۰ - ۱۵۰ جفت باز به دست آمد که از این تعداد ۵۰ نوار آن چند شکل (۸۶/۲٪) و هشت نوار آن (۱۳/۸٪) تک شکل بود (شکل ۲). بیشترین تعداد نوارهای تولید شده در آغازگر MYB2 (۱۳ نوار) و کمترین تعداد نوارهای



شکل ۱- الگوی نوارهای تکثیرشده با استفاده ازآغازگر SCoT12 در ۴۰ گیاه مورد مطالعه *S. marianum*

Fig. 1. Banding pattern of SCoT12 marker in 40 studied *S. marianum* plants.



شکل ۲- الگوی نوارهای تکثیرشده با استفاده ازآغازگر MYB1 در ۴۰ گیاه مورد مطالعه *S. marianum*

Fig. 2. Banding pattern of MYB1 marker in 40 studied *S. marianum* plants.

قابل ارزیابی درآغازگر WRKY-R3B (۶ نوار) با میانگین چندشکلی ۱۴/۷ مشاهده شد (جدول ۲). به طور کلی نشانگرهای CDDP چندشکلی بالاتری نسبت به نشانگرهای SCoT نشان دادند. بر اساس یافته‌های تحقیق انجام شده در ژنوتیپ‌های نخود به منظور ارزیابی قرابت ژنتیکی با استفاده از نشانگرهای CDDP و SCoT نیز نشانگرهای CDDP درصد چندشکلی بیشتری (۹۱٪) نسبت به نشانگرهای SCoT (۸۸٪) نشان دادند (Hajibarat *et al.*, 2015) که با نتایج این پژوهش شباهت داشت.

کمترین و بیشترین شاخص محتوای اطلاعات چندشکلی (PIC) در پژوهش حاضر برای نشانگر SCoT به ترتیب در آغازگر SCoT49 (۰/۱۲) و SCoT42 (۰/۳۵) با میانگین ۰/۲۳ برای کل آغازگرها محاسبه شد. اما در نشانگر CDDP کمترین مقدار PIC متعلق به آغازگر WRKY-R3B (۰/۳۱) و بیشترین مقدار PIC متعلق به آغازگر KNOX-1 (۰/۴۵) بود و میانگین PIC برای کل آغازگرها (۰/۳۹) بدست آمد (جدول ۲). در تحقیقی جهت بررسی تنوع ژنتیکی ۴۰ رقم گندم اصلاح شده ایرانی با استفاده از نشانگرهای مولکولی SCoT و CDDP، میانگین شاخص محتوای چندشکلی حاصل از نشانگرهای SCoT و CDDP به ترتیب برابر با ۲۱/۵۱ و ۳۴/۵۴ درصد گزارش شد (Hamidi *et al.*, 2014).

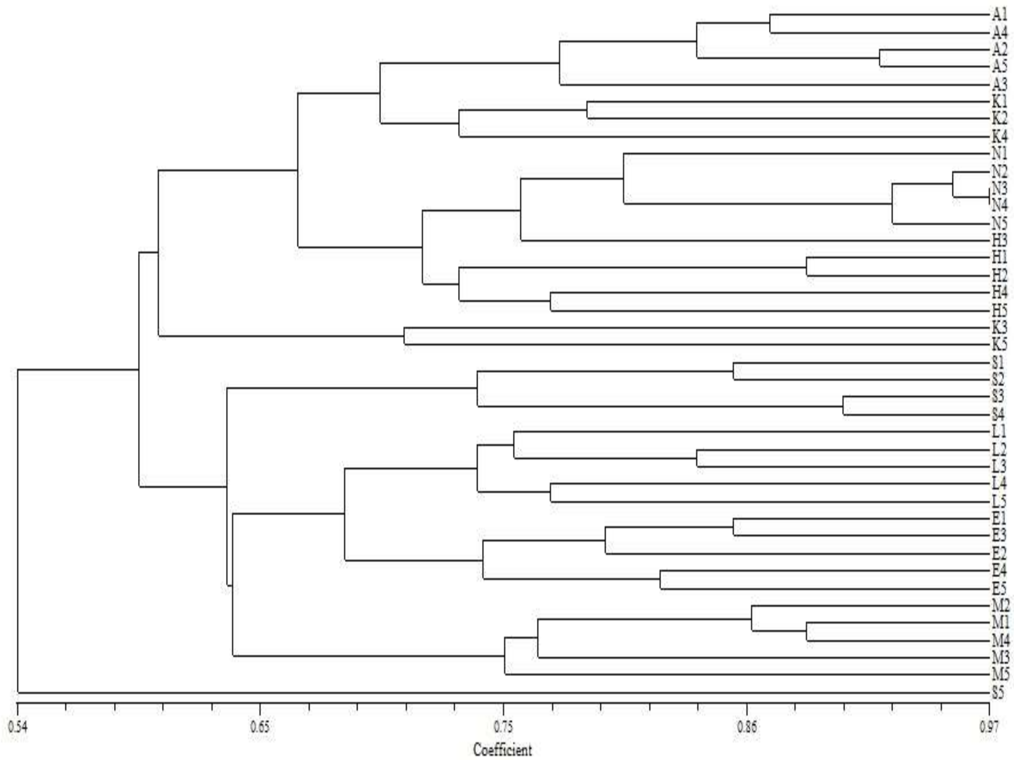
شاخص محتوای چندشکلی یکی از شاخص‌های مهم جهت مقایسه نشانگرهای مختلف از نظر قدرت تمایز آن‌هاست. مقادیر بالای این شاخص، دلالت بر چندشکلی زیاد در یک جایگاه دارد که در تمایز

افراد نقش به‌سزایی ایفا می‌کنند (Thimmappaiah *et al.*, 2008). بنابراین آغازگر SCoT42 و آغازگر KNOX-1 با بیشترین مقدار PIC از قدرت بیشتری به منظور شناسایی تنوع ژنتیکی برخوردارند.

در این پژوهش شاخص نشانگر (Marker Index: MI) در آغازگر SCoT6 (۳/۸۶) و MYB2 (۵/۵۹) بیشترین مقدار بود که نشان می‌دهد این نشانگر از قدرت تفکیک بسیار خوبی برخوردار است (جدول ۲). به‌طور میانگین میزان شاخص نشانگر برای نشانگرهای SCoT و CDDP به ترتیب ۱/۷۹ و ۲/۸۹ بدست آمد. شاخص نشانگر یک برآورد مناسب برای کارآیی آغازگرهاست که به تعداد نوارهای چندشکل به‌دست‌آمده توسط نشانگر نسبت داده می‌شود (Milbourne *et al.*, 1997). بالا بودن شاخص نشانگر، نشان از فراهم کردن اطلاعات بیشتر از ژنوم با توجه به تولید تعداد نوار چندشکلی بیشتر است. بر اساس نتایج بدست آمده در پژوهش حاضر در مجموع نشانگر CDDP با توجه به مقادیر بالاتر تعداد نوارهای چندشکل، شاخص محتوای چندشکلی و شاخص نشانگر، اطلاعات چندشکلی بیشتری نسبت به نشانگر SCoT نشان داد.

ضریب همبستگی بین ماتریس کوفنینگ از دندروگرام و ماتریس تشابه برای نشانگرهای SCoT و CDDP به ترتیب ۰/۷۴ و ۰/۷۹ محاسبه شد. میزان بالای این ضریب نشان دهنده ارزیابی مشابهی از روابط ژنتیکی توسط هر دو نشانگر است. در تجزیه کلاستر بر اساس نشانگر SCoT سه کلاستر اصلی در درجه تشابه ۷۰ درصد و ضریب کوفنینگ ۰/۷۵ به دست آمد (شکل ۳). در گروه اول، جمعیت‌های اردستان (A)، خرم‌آباد (K)، خمین (N) و اهواز (H)، در گروه دوم جمعیت ساری (S) و در گروه سوم جمعیت‌های ملاثانی (L)، سفید اصفهان (E) و مجارستان (M) قرار گرفتند. قرار گرفتن ارقام خارجی خار مریم در کنار اکوتیپ‌های ایرانی در پژوهش محمدی و همکاران (Mohammadi *et al.*, 2011)، همچنین سقالی و همکاران (Saghalli *et al.*, 2016) نیز گزارش شده است و تنوع ژنتیکی بالای خارمریم به عنوان عاملی جهت حصول این نتیجه بیان شده است.

بر اساس نتایج تجزیه کلاستر بر اساس نشانگر CDDP چهار کلاستر اصلی در درجه تشابه ۵۳٪ و ضریب کوفنینگ ۰/۶۴ تعیین شد (شکل ۴). گروه اول جمعیت‌های اردستان (A)، خرم‌آباد (K) و خمین (N)، گروه دوم سفید اصفهان (E) و مجارستان (M)، گروه سوم ملاثانی (L)، ساری (S) و اهواز (H) و گروه چهارم ملاثانی (L) و خمین (N) و اهواز (H) را شامل شد. با توجه به اینکه منبع تنوع شناسایی شده در هر یک از نشانگرهای مورد استفاده متناسب با مناطق هدف در ژنوم، متفاوت است، از اینرو اختلاف بین دندروگرام‌های به دست آمده توسط SCoT و CDDP می‌تواند با ماهیت متفاوتی از هر روش، میزان چندشکلی،

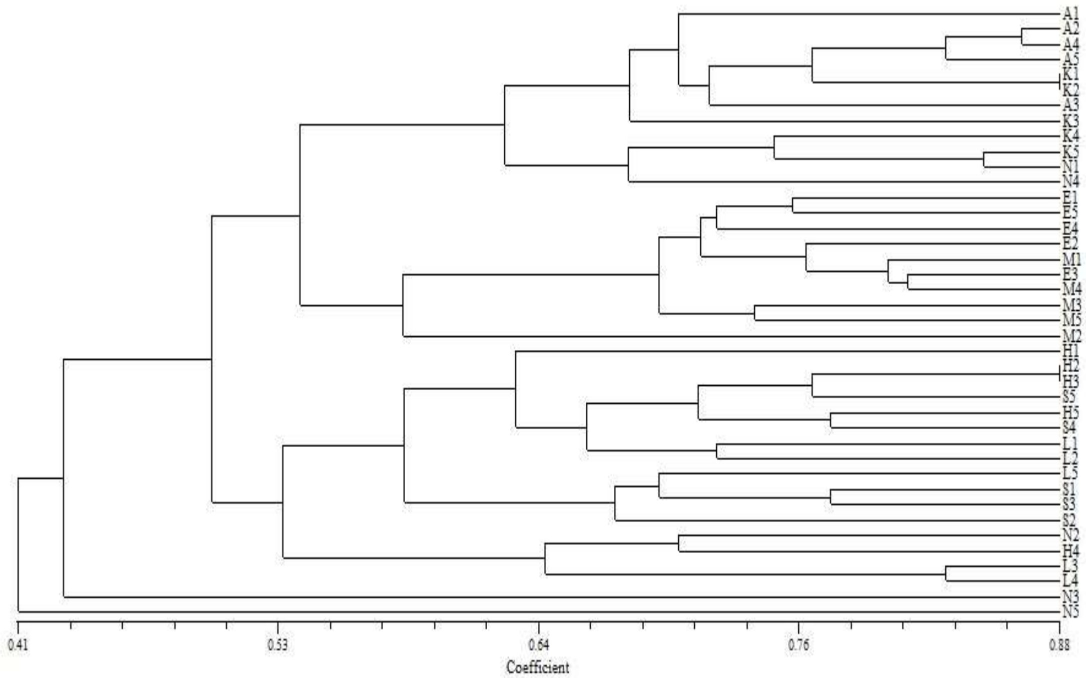


شکل ۳- دندروگرام UPGMA مبتنی بر ضریب شباهت ساده انطباق مربوط به ۴۰ گیاه خار مریم مورد مطالعه با استفاده از داده‌های SCoT. علائم اختصاری مربوط به هر نمونه جمعیتی در جدول ۴ ارائه شده است.

Fig. 3. UPGMA-derived dendrogram of 40 *S. marianum* plants based on simple matching coefficient using SCoT data. For accessions designations refer to Tabel 4.

پوشش منطقه خاصی از ژنوم توسط هر نشانگر و تعداد لوکوس‌ها توضیح داده شود (Souframanien and Gopalakrishna, 2004; Gorji *et al.,* 2011). نتایج بدست آمده در تحقیق حاضر با نتایج بدست آمده از طریق خوشه‌بندی ژنوتیپ‌ها با استفاده از نشانگرهای مختلف از نظر اختلاف بین دندروگرام‌های به دست آمده توسط هر یک از نشانگرهای مورد استفاده در مطالعات متعددی از جمله نخود (Pakseresht *et al*., 2013; Hajibarat *et al,* 2005)، گندم (Hamidi *et al*., 2014) و سیب زمینی (Gorji *et al*., 2011) شباهت نشان داد.

بر اساس نتایج حاصل از تحلیل (Analysis of Molecular Variance: AMOVA)، بیشترین تنوع در درون جمعیت‌ها مشاهده شد (جدول ۳). در مطالعه انجام‌شده توسط محمدی و همکاران (Mohammadi *et al*., 2011) نیز تنوع درون‌گونه‌ای جمعیت‌های مورد مطالعه خارمریم بیش‌تر از میان‌گونه‌ای گزارش شد. در مطالعات شکرپور و همکاران (Shokrpour *et al*., 2008) نیز بر اساس تجزیه



شکل ۴- دندروگرام UPGMA مبتنی بر ضریب شباهت ساده انطباق مربوط به ۴۰ گیاه خار مریم مورد مطالعه با استفاده از داده‌های CDDP. علائم اختصاری مربوط به هر نمونه جمعیتی در جدول ۴ ارائه شده است.

Fig. 4. UPGMA-derived dendrogram of 40 *S. marianum* plants based on simple matching coefficient using CDDP data. For accessions designations refer to Tabel 4.

جدول ۳- تجزیه واریانس مولکولی داده‌های حاصل از داده‌های نشانگرهای SCoT و CDDP

Table 3. Analysis of molecular variance using SCoT and CDDP markers data

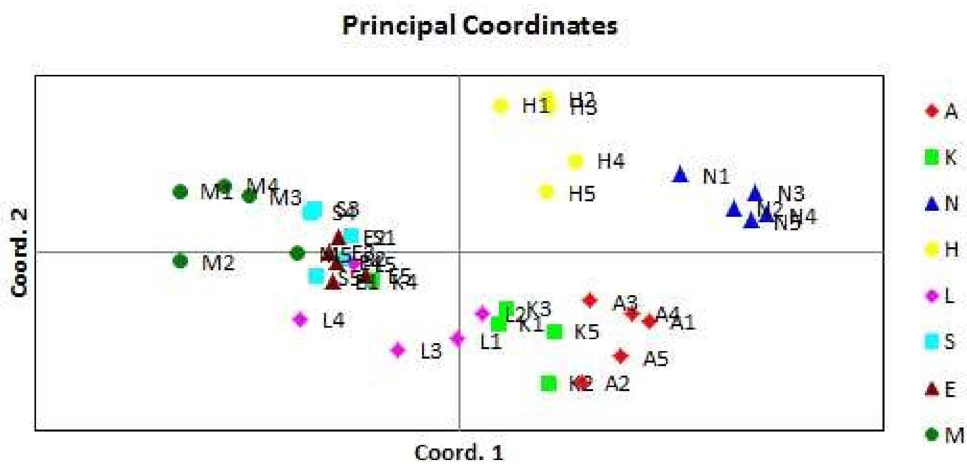
		SCoT				CDDP		
S.O.V.	منبع تغییرات	درجه آزادی df	میانگین مربعات MS	انحراف معیار SE	واریانس (٪) Variance (%)	میانگین مربعات MS	انحراف معیار SE	واریانس (٪) Variance (%)
Between accession	بین جمعیتی	7	218.925	4.831	40	231.950	4.805	35
Within accession	درون جمعیتی	32	227.800	7.119	60	291.600	7.113	65
Total	کل	39	446.725	11.950	100	523.550	13.917	100

واریانس مولکولی تنوع ژنتیکی درون‌گونه‌ای بیش‌تری بین اکوتیپ‌های مورد مطالعه خار مریم با استفاده از نشانگر مولکولی ISSR مشاهده شد.

هرچند در گونه‌های خودگرده‌افشان انتظار می‌رود تنوع ژنتیکی بین جمعیت‌ها نسبتا بالاتر باشد، با این وجود جریان ژنی، جهش و همچنین اندازه جمعیت می‌توانند به طور قابل

توجهی تنوع ژنتیکی گونه‌ها را تحت تاثیر قرار دهند (Jin and Lu, 2008). نتایج تحقیقات متعددی حاکی از آن است که تولید مثل کم در جمعیت می‌تواند تنوع ژنتیکی را افزایش دهد (Iranjo *et al*., 2016; Yan *et al*., 2016). علاوه بر این تمایز ژنتیکی پایین و سطوح بالای جریان ژنتیکی نیز می‌توانند به دلیل ترکیبی از عوامل مانند گیاهان چند ساله، خودناسازگاری، پراکندگی زیاد و دخالت انسان در جابجایی روی دهد (Yan *et al*., 2016).

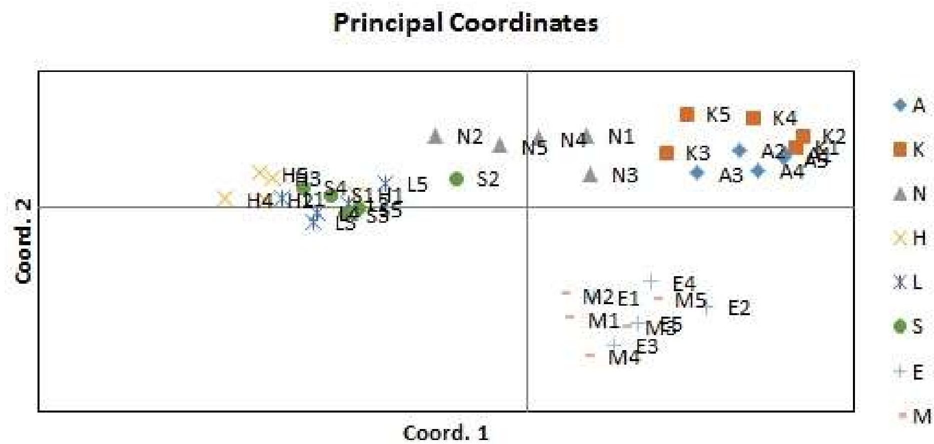
در تجزیه و تحلیل (Principal Coordinates Analysis: PCoA) نشانگر SCoT، جمعیت‌ها به سه گروه مجزا تقسیم شدند. گروه یک شامل اردستان (A)، خرم‌آباد (K) و ملاثانی (L)، گروه دوم خمین (N) و اهواز (H)، گروه سوم مجارستان (M)، سفید اصفهان (E) و ساری (S) بود (شکل ۵). بر اساس نتایج تحلیل PCoA در نشانگر CDDP نیز جمعیت‌ها به سه گروه مجزا تقسیم شدند که در گروه یک نمونه‌های جمعیتی اردستان (A)، خرم‌آباد (K) و خمین (N)، در گروه دوم نمونه‌های جمعیتی ملاثانی (L)، ساری (S) و اهواز (H) و در گروه سوم نیز نمونه‌های جمعیتی مجارستان (M) و سفید اصفهان (E) قرار گرفتند (شکل ۶).



شکل ۵- نمودار پلات دو بعدی مختصات اول و دوم برای داده‌های نشانگر SCoT برای ۴۰ گیاه مورد مطالعه خار مریم (*S. marianum* L.)

Fig. 5. Two dimensional plot of first and second components coordinates of SCoT marker data for 40 *S. marianum* plant

تجزیه و تحلیل تشابه ژنتیکی گواه این بود که بیشترین فاصله ژنتیکی (کمترین تشابه) بر اساس نشانگر SCoT بین جمعیت‌های مجارستان (M) و خمین (N) (۲/۱۳۹) و بر



شکل ۶- نمودار پلات دو بعدی مختصات اول و دوم برای داده های نشانگر CDDP برای ۴۰ گیاه مورد مطالعه خارمریم (*S. marianum* L.)

Fig. 6. dimensional plot of first and second components coordinates of CDDP marker data for 40 *S. marianum* plant

اساس نشانگر CDDP بین جمعیت‌های اردستان (A) و اهواز (H) (۰/۹۶۲) وجود داشت. در حالی که کمترین فاصله ژنتیکی (بیشترین تشابه ژنتیکی) بر اساس نشانگر SCoT بین جمعیت‌های خرم آباد (K) و اردستان (A) (۰/۲۴۲) و بر اساس نشانگر CDDP بین جمعیت‌های مجارستان (M) و سفید اصفهان (E) (۰/۰۴۶) مشاهده شد.

بر اساس نتایج بدست آمده از گروه‌بندی‌های انجام شده نمونه‌های جمعیتی اردستان و خرم‌آباد عمدتا در یک گروه قرار گرفتند و تشابه ژنتیکی بیشتری نسبت به سایر نمونه‌های جمعیتی نشان دادند با اینحال در برخی از موارد تطابق کاملی بین گروه‌بندی نمونه‌های جمعیتی با منشا جغرافیایی مشاهده نشد. بر اساس نتایج گزارش شده از مطالعات انجام شده در گیاه خارمریم با استفاده از نشانگرهای ISSR (Saghalli *et al.*, 2016)، AFLP (Mohammadi *et al.*, 2011) و SSR (Hoseini, 2011) نیز عدم انطباق کامل بین گروه‌بندی اکوتیپ‌های خارمریم توسط نشانگرهای مولکولی با مناطق جغرافیایی گزارش شده است. سقالی و همکاران (Saghalli *et al.*, 2016) علت این عدم انطباق را تنوع بالای این گیاه و یا جابجایی بذور بین مناطق گزارش نمودند. علاوه بر تنوع ژنتیکی، عوامل متعدد دیگری از جمله جریان ژنی، جهش و انتخاب طبیعی (Schaal *et al.*, 1998; Shokrpour *et al.*, 2007) همراه با نوع نشانگر ژنتیکی و توزیع جغرافیایی در یک گروه جغرافیایی می‌توانند تمایز ژنتیکی را تحت تاثیر قرار دهند.

در نهایت میزان چندشکلی به کمک داده‌های نشانگر SCoT در جمعیت‌های خرم‌آباد (K) (۶۱/۲۹٪) و به کمک داده‌های نشانگر CDDP در جمعیت‌های ساری(S) و مجارستان(M) (۶۰/۳۴٪) بیش از سایر جمعیت‌ها محاسبه شد (جدول ۴).

جدول ۴- مقایسه میزان چندشکلی (٪) در بین نمونه‌های جمعیتی خار مریم مورد مطالعه

Table 4. Comparison of polymorphism ratio (%) among studied *S. marianum* accessions

نمونه جمعیتی Accession	اردستان (A)	خرم‌آباد (K)	خمین (N)	اهواز (H)	ملاثانی (L)	ساری (S)	سفید اصفهان (E)	مجارستان (M)	میانگین Mean
SCoT	33.85	61.29	25.81	51.61	50.00	41.94	45.16	41.94	43.94
CDDP	39.66	50.00	41.38	39.66	56.60	60.34	51.72	60.34	49.96

A: Ardestan, K: Khorramabad, N: Khomein, H: Ahvaz, L: Mollasani, S: Sari, E: White Isfahan, M: Hungary

بنابراین با توجه به تنوع ژنتیکی بالای مشاهده شده در نمونه‌های مورد مطالعه، ژرم‌پلاسم این جمعیت‌ها می‌توانند به منظور شناسایی آلل‌های مفید بویژه در راستای اهداف به‌نژادی مهم در خارمریم از جمله افزایش میزان متابولیت‌های ثانویه در این گیاه مانند سیلیمارین، افزایش عملکرد بذر، همزمانی در گلدهی و عدم ریزش دانه مورد توجه بیشتری قرار گیرند.

نتیجه‌گیری نهایی

با توجه به میزان بالای چندشکلی بدست آمده با استفاده از نشانگرهای CDDP و SCoT، این نشانگرها ابزارهایی کارآمد و قدرتمند به‌منظور بررسی روابط ژنتیکی در میان جمعیت‌های خار مریم (*S. marianum* L.) بودند و از قابلیت بالایی جهت تفکیک جمعیت‌های خار مریم برخوردارند. بنابراین می‌توانند در اجرای برنامه‌های به‌نژادی مانند ارزیابی تنوع ژنتیکی، شناسایی ژنوتیپ‌ها و نقشه‌یابی QTL ها نیز مورد استفاده قرار گیرند.

References

Alemardan, A., Karkanis, A., and Salehi, R. 2013. Breeding objectives and selection criteria for milk thistle [*Silybum marianum* (L.) Gaertn.] improvement. Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca 41: 340-347.

Arif, M., Zaidi, N. W., and Singh, Y. P. 2009. A comparative analysis of ISSR and RAPD markers for study of genetic diversity in shisham (*Dalbergia sissoo*). Plant Molecular Biology Reporter 27: 488-495.

Bhattacharya, P., Kumaria, S., Kumar, S., and Tandon, P. 2013. Start codon targeted (SCoT) marker reveals genetic diversity of *Dendrobium nobile* Lindl. an endangered medicinal orchid species. Gene 529: 21-26.

Carvalho, M. A. 2004. Germplasm characterization of *Arachis pintoi* Krap. and Greg. (*Leguminosae*). Ph. D. Thesis, University of Florida, USA. 154pp.

Chung, M. Y., Nason, J. D., and Chung, M. G. 2004. Spatial genetic structure in populations of the terrestrial orchid *Cephalanthera longibrateata* (Orchidaceae). American Journal of Botany 91: 52–57.

Collard, B. C. Y., and Mackill, D. J. 2009a. Start codon targeted (SCoT) polymorphism: a simple and novel DNA marker technique for generating gene-targeted markers in plants. Plant Molecular Biology Reporter 27(1): 86.

Collard, B. C. Y., and Mackill, D. J. 2009b. Conserved DNA-derived polymorphism (CDDP): a simple and novel method for generating DNA markers in plants. Plant Molecular Biology Reporter 27(4): 558.

de Vicente, M. C., Guzmán, F. A., Engels, J., and Rao, V. R. 2005. Genetic characterization and its use in decision making for the conservation of crop germplasm. The role of biotechnology. Pp. 121-128. In: Proceedings of the International workshop on the role of biotechnology for the characterization and conservation of crop, forestry, animal and fishery genetic resources.

Gorji, A. M., Poczai, P., Polgar, Z., and Taller, J. 2011. Efficiency of arbitrarily amplified dominant markers (SCoT, ISSR and RAPD) for diagnostic finger printing in tetraploid potato. American Journal of Potato Research 88: 226-237.

Guo, D. L., Zhang, J. Y., and Liu, C. H. 2012. Genetic diversity in some grape varieties revealed by SCoT analyses. Molecular Biology Reports 39: 5307-5313.

Hajibarat, Z., Saidi, A., and Talebi, R. 2015. Characterization of genetic diversity in chickpea using SSR markers, start codon targeted polymorphism (SCoT) and conserved DNA-derived polymorphism (CDDP). Physiology and Molecular Biology of Plants 21(3): 365-373.

Hamidi, R., Siahpoosh, M., Mamaghani, R., and Siahpoosh, A. 2014. Evaluation of the genetic diversity of 10 Milk Thistle (*Silybum marianum* L.) ecotypes using morphological, phenological and phytochemical traits. Journal of Plant Production 37(1): 37-47.

Hamidi, H., Talebi, R., and Keshavarzi, F. 2014. Comparative efficiency of functional gene-based markers, start codon targeted polymorphism (SCoT) and conserved dNA-derived polymorphism (CDDP) with ISSR markers for diagnostic finger printing in wheat (*Triticum aestivum L.).* Cereal Research Communications 42: 558-567.

Hamrick, J. L., and Godt, M. J. W. 1996. Effects of life history traits on genetic diversity in plant species. Philosophical Transactions of the Royal Society of London Series B351: 1291-1298.

Hoseini, S. A. 2011. Investigation of genetic diversity of medicinal plants (*Silybum marianum* L.) using SSR molecular marker. M. Sc. Thesis. Tarbiat Modarres University (in Persian).

Iranjo, P., Nabati Ahmadi, D., Sorkheh, K., Memeari, H. R., and Ercisli, S. 2016. Genetic diversity and phylogenetic relationships between and within wild Pistacia species populations and implications for its conservation. Journal of Forestry Research 27(3): 685-697.

Jin, Y., and Lu, B. 2003. Sampling strategy for genetic diversity. Chinese Biodiversity 11(2):155-161.

Katiyar, S. K., Meleth, S., and Sharma, S. D. 2008. Silymarin, a flavonoid from Milk Thistle (*Silybum marianum* L.), inhibits UV induced oxidative stress through targeting infiltrating CD11b+ Cells in mouse skin. Photochemistry and Photobiology 84(2): 266-271.

Li, T., Guo, J. E., Li, Y., Ning, H., Sun, X., and Zheng, C. 2013. Genetic diversity assessment of *chrysanthemum* germplasm using conserved DNA-derived polymorphism markers. Scientia Horticulturae 162: 271-277.

Luo, C., He, X. H., Chen, H., Ou, S. J., Gao, M. P., Brown, J. S., Tondo, C. T. and Schnell, R. J. 2011. Genetic diversity of mango cultivars estimated using SCoT and ISSR markers. Biochemical Systematics and Ecology 39: 676-684

Milbourne, D., Meyer, R., Bradshaw, J. E., Baird, E., Bonar, N., Provan, J., Powell, W., and Waugh, R. 1997. Comparison of PCR-based marker systems for the analysis of genetic relationships in cultivated potato. Molecular Breeding 3: 127-136.

Mohammadi, S. A., Shokrpour, M., Moghaddam, M., and Javanshir, A. 2011. AFLP-based molecular characterization and population structure analysis of *Silybum marianum* L. Plant Genetic Resources 9(3): 445-453.

Murray, M. G., and Thompson, W. F. 1980. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. Nucleic Acids Research 8(19): 4321-4326.

Pakseresht, F., Talebi, R., and Karami, E. 2013. Comparative assessment of ISSR, DAMD and SCoT markers for evaluation of genetic diversity and conservation of chickpea (*Cicer arietinum* L.) genotypes collected from north-west of Iran. Physiology and Molecular Biology of Plants 19(4): 563-574.

Poczai, P., Varga, I., Bell, N. E., and Hyvönen, J. 2011. Genetic diversity assessment of bittersweet (*Solanum dulcamara*, Solanaceae) germplasm using conserved DNA-derived polymorphism and intron-targeting markers. Annals of Applied Biology 159: 141-153.

Que, Y., Pan, Y., Lu, Y., Yang, C., Yang, Y., Huang, N., and Xu, L. 2014. Genetic analysis of diversity within a Chinese local sugarcane germplasm based on start codon targeted polymorphism. BioMed Research International. http://dx.doi.org/10.1155/2014/468375. 10 pp.

Rohlf, F. J. 1993. NTSYS-PC. Numerical taxonomy and multivariate analysis system version 1.80 exeter software, Setauket, New York. 44 pp.

Saghalli, A., Farkhari, M., Salavati, A., Alami Saeid, Kh., and Abdali, A. 2016. Genetic diversity assessment of Milk Thistle (*Silybum marianum* L.) ecotypes using ISSR markers. Journal of Agricultural Biotechnology 8(3): 51-64. (in Persian)

Schaal, B. A., Hayworth, D. A., Olsen, K. M., Rauscher, J. T., and Smith, W. A. 1998. Phylogeographic studies in plants: problems and prospects. Molecular Ecology 7(4): 46-474.

Shokrpour, M., Moghaddam, M., Mohammadi, S. A., Ziai, S. A., and Javan-Shir, A. 2007. Genetic properties of milk thistle ecotypes from Iran for morphological and flavonolignan characters. Pakistan Journal of Biological Sciences 10: 3266-3271.

Shokrpour, M., Mohammadi, S. A., Moghaddam, M., Ziai, S., and Javanshir, A. 2008. Analysis of morphologic association, phytochemical and AFLP markers in Milk Thistle (*Silybum marianum* L.). Iranian Journal of Medicinal and Aromatic Plants 24(3): 278-292.

Sonah, H., Deshmukh, R. K., Singh, V. P., Gupta, D. K., Singh, N. K., and Sharma, T. R. 2011. Genomic resources in horticultural crops: status, utility and challenges. Biotechnology Advance 29: 199-209.

Souframanien, J., and Gopalakrishna, T. 2004. A comparative analysis of genetic diversity in blackgram genotypes using RAPD and ISSR markers. Theoretical and Applied Genetics 109(8): 1687-1693

Thimmappaiah, W., Santhosh, G., Shobha, D., and Melwyn, G. S. 2008. Assessment of genetic diversity in cashew germplasm using RAPD and ISSR markers. Scientia Horticulturae 118: 1-7.

Trapnell, D. W., Schmidt, J. P., and Hamrick, J. L. 2008. Spatial genetic structure of the Southeastern North American endemic, *Ceratiola ericoides* (Empetraceae). Journal of Heredity 99: 604-609.

Wang, X., Fan, H., Li, Y., Sun, X., Sun, X., Wang, W., and Zheng, C. 2014. Analysis of genetic relationships in tree peony of different colors using conserved DNA-derived polymorphism markers. Scientia Horticulturae 175: 68-73.

Wang, X., Zhao, F., Hu, Z., Critchley, A. T., Morrell, S. L., and Duan, D. 2008. Inter simple sequence repeat (ISSR) analysis of genetic variation of *Chonadrus cripus* populations from North Atlantic. Aquatic Botany 88: 154-159.

Williams, J. G. K., Kubelik, A. R., Livak, K. J., Rafalski, J. A., and Tingey, S. C. 1990. DNA polymorphsims amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. Nucleic Acids Research 18: 6531-6535.

Xiong, F., Zhong, R., Han, Z., Jiang, J., He, L., Zhuang, W., and Tang, R. 2011. Start codon targeted polymorphism for evaluation of functional genetic variation and relationships in cultivated peanut (*Arachis hypogaea L.*) varieties. Molecular Biology Reports 38(5): 3487-3494.

Xiong, F. Q., Tang, R. H., Chen, Z. L., Pan, L. H., and Zhuang, W. J. 2009. SCoT: a novel gene targeted marker technique based on the translation start codon. Molecular Plant Breeding 7: 635-638.

Yan, J., Zhu, M., Liu, W., Xu, Q., Zhu, C., Li, J., and Sang, T. 2016. Genetic variation and bidirectional gene flow in the riparian plant *Miscanthus lutarioriparius*, across its endemic range: implications for adaptive potential. GCB Bioenergy, 8(4): 764-776.

Zarei, P., Badakhshan, H., and Mirzakaderi, A. 2014. Characteristics of the genetic diversity in wild Oat using the SCoT molecular marker. Pp. 1-6. In: Proceedings of 1st International Congress and 13th Iranian Congress of Genetics, Tehran, Iran (in Persian)

Zhang, J., Wengang Xie., Wang. Y., and Zhao, X. 2015. Potential of start codon targeted (SCoT) markers to estimate genetic diversity and relationships among Chinese *Elymus sibiricus* Accessions. Molecules 20: 5987-6001.